

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5343825号  
(P5343825)

(45) 発行日 平成25年11月13日(2013.11.13)

(24) 登録日 平成25年8月23日(2013.8.23)

(51) Int.Cl. F 1  
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 A

請求項の数 2 (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2009-273905 (P2009-273905)	(73) 特許権者	000003300
(22) 出願日	平成21年12月1日(2009.12.1)		東ソー株式会社
(65) 公開番号	特開2011-117779 (P2011-117779A)		山口県周南市開成町4560番地
(43) 公開日	平成23年6月16日(2011.6.16)	(72) 発明者	堀田 秀樹
審査請求日	平成24年11月14日(2012.11.14)		神奈川県綾瀬市早川2743-1 東ソー株式会社 東京研究センター内
		(72) 発明者	新谷 晃司
			神奈川県綾瀬市早川2743-1 東ソー株式会社 東京研究センター内
		審査官	加々美 一恵

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液中のステロイドホルモン又はビタミン類の測定法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

2 - ヒドロキシ - 3 - ナフトエ酸、2 - アミノナフタレンスルホン酸、アニリン - 2 , 5 - ジスルホン酸、3 - アミノ - 2 , 7 - ナフタレンジスルホン酸及びそれらの塩からなる群から選ばれる一種以上を共存させることを特徴とする、ステロイドホルモンの免疫測定方法。

【請求項2】

ステロイドホルモンがエストラジオール、テストステロン、プロゲステロン、コルチゾール、アンドロステンジオン又はデヒドロエピアンドロステロン硫酸である請求項1に記載の免疫測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血液中のステロイドホルモン又はビタミン類（以下、両者を纏めて「小分子」と記載することがある）を免疫学的に測定する方法において、反応系に2 - ヒドロキシ - 3 - ナフトエ酸、2 - アミノナフタレンスルホン酸、アニリン - 2 , 5 - ジスルホン酸、3 - アミノ - 2 , 7 - ナフタレンジスルホン酸及びそれらの塩からなる群から選ばれる一種以上（以下、「蛋白質結合阻害剤」と記載することがある）を共存させることによって血液中のステロイドホルモン又はビタミン類の濃度を正確に測定する方法に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

血液中の小分子は、その大部分が特異的又は非特異的に蛋白質、脂質などと結合している。そのためそれら小分子の濃度を正確に精度良く測定するためには、小分子を前記蛋白質等から遊離する必要がある。なお、小分子類には、それぞれ特異的な結合蛋白質が存在し、血液中での安定性の向上に貢献している。例えばセックスホルモン・バイディンググロブリンやビタミンDバイディングプロテイン(DBP)などが良く知られている。

## 【0003】

従来知られているステロイドホルモンの特異的結合阻害剤は、コルチゾールの免疫測定法におけるグルタミン酸溶液(特許文献1)、同じくコルチゾールの分析方法における8  
アニリノ 1 ナフタレンスルホン酸又はその塩(特許文献2)が報告されている。ピ  
タミンD代謝産物の特異的結合阻害剤は、ビタミンD代謝産物の検出方法における8  
アニリノ 1 ナフタレンスルホン酸アンモニウム塩、3 (アセトニルベンジル) 4  
ヒドロキシマリノおよび水和性溶媒を含む非競合置換剤(特許第3787121)、ピ  
タミンDアッセイにおける0.01~5%のシクロデキストリン、0.01~5%のサリ  
チル酸ナトリウム、及び0.1~1.0MのNaOHを含む遊離剤(特許文献3)が報告  
されている。

10

## 【0004】

【特許文献1】特開昭53-101521号公報

【特許文献2】特開昭61-12547号公報

20

【特許文献3】特許第4130958号公報

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0005】

前記したグルタミン酸溶液等を用いたとしても、エストラジオール測定試薬のように低濃度域の測定精度が要求される場合、これらの添加だけでは十分な感度を得ることは困難である。グルタミン酸溶液等を高濃度となるように添加することにより感度をあげることは可能であるが、その一方で小分子を免疫測定するための反応(免疫反応)への影響が生じる可能性があり、一概に高濃度となるように添加することも困難である。

## 【課題を解決するための手段】

30

## 【0006】

本発明者らは、上記のような状況に鑑みて鋭意検討を行った結果、小分子を免疫学的に測定する方法において、反応系に蛋白質結合阻害剤を共存させることによって小分子の濃度を正確に測定できることを見出し、本発明を完成するに至った。即ち本発明は、2  
ヒドロキシ 3 ナフトエ酸、2 アミノナフタレンスルホン酸、アニリン 2, 5 ジス  
ルホン酸、3 アミノ 2, 7 ナフタレンジスルホン酸及びそれらの塩からなる群から  
選ばれる一種以上を共存させることを特徴とする、ステロイドホルモン又はビタミン類の  
免疫測定方法である。以下、本発明を詳細に説明する。

## 【0007】

本発明でいう小分子は、ステロイドホルモン又はビタミン類という、分子量の小さい測定対象である。ステロイドホルモンとしては、例えば、エストラジオール、テストステロン、プロゲステロン、コルチゾール、アンドロステンジオン又はデヒドロエピアンドロステロン硫酸等が例示でき、ビタミン類としては、例えば、25  
ヒドロキシビタミンDなどのビタミンD代謝産物、そしてビタミンB12、葉酸等を例示することができる。

40

## 【0008】

小分子の測定に適用される免疫測定方法は、その原理や検出のためのラベルの種類を問わないものである。即ち、原理としてはサンドイッチ法、競合法、凝集法等を使用することができ、ラベルとしては放射性同位元素、酵素、化学発光、又は生物化学発光等を使用することができる。中でも、原理上測定感度が高く、かつ、実施に当たって特別な取扱いを要する試薬を使用する必要のない、酵素、蛍光物質又は化学発光物質をラベルとして用

50

いた、サンドイッチ法又は競合法が好ましい。

【0009】

共存させる蛋白質結合阻害剤は、2-ヒドロキシ-3-ナフトエ酸、2-アミノナフタレンスルホン酸、アニリン-2,5-ジスルホン酸、3-アミノ-2,7-ナフタレンジスルホン酸及びそれらの塩からなる群から選ばれる一種以上であれば良い。即ち、これらのうちの一種類を単独で用いても、二種類以上を混合して用いてもよい。特に二種類以上を用いる場合には、個々の蛋白質結合阻害剤の相乗的な効果を期待することができる。

【0010】

蛋白質結合阻害剤は、上記した免疫測定を実施する際に、反応系に共存させる、即ち免疫反応を生じさせる反応液に添加すれば良い。共存させる濃度は、重量/体積(w/v)換算で0.1~20%、好ましくは0.5~10%であり、二種以上を混合して用いる場合にはその総量がこの範囲となるようにすれば良い。

10

【0011】

蛋白質結合阻害剤の共存のさせ方に特別な制限はなく、小分子と先に接触させる、免疫反応用の成分(抗原や抗体等)と先に接触させる、小分子及び免疫反応用の成分と同時に接触する、のいずれであっても良い。

【0012】

蛋白質結合阻害剤共存下での免疫反応は、該阻害剤非存在下の免疫反応と同様に、即ち同様の反応温度、時間で行うことができる。

【発明の効果】

20

【0013】

本発明によれば、蛋白質結合阻害剤を共存させるだけで、小分子の濃度を精度良く測定することが可能となる。例えば、臨床検査において非常に有効な手段であるEIA、RIAで測定されている小分子は、その大部分が特異的、非特異的に蛋白質や脂質などと結合しているため、低濃度の小分子を精度よく測定することは容易ではない。そのような測定系にて、正確な小分子濃度を測定することは非常に有用であり、高精度な測定、測定時間の短縮、自動化への発展に対する多くの要望を簡便に解決するものであり、その応用範囲は広い。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

実施例

30

【0015】

以下、実施例により本発明を更に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【実施例1】

【0016】

免疫測定装置としてAIA-1800自動免疫測定装置(商品名、東ソー(株)製)を用い、1ステップ競合法によりデヒドロエピアンドロステロン硫酸の測定を行った。なお、測定に必要な試薬は後述したようにして調製した。

【0017】

40

まず、ヤギ抗ウサギ抗体を固定化した担体及びアルカリ性フォスファターゼにて標識されたデヒドロエピアンドロステロン硫酸とウサギ抗デヒドロエピアンドロステロン硫酸抗体を含む反応カップに試験試料(血清)を添加し37℃にて攪拌保温した。なお反応カップは、試験試料添加時に標識デヒドロエピアンドロステロン硫酸と競合して反応するようにするため最初にヤギ抗ウサギ抗体を固定化した担体とアルカリ性フォスファターゼ標識デヒドロエピアンドロステロン硫酸溶液を分注して凍結した後、ウサギ抗デヒドロエピアンドロステロン硫酸抗体溶液を分注して凍結し凍結乾燥したものを作製した。

【0018】

次に、未反応物をB/F分離により除去しデヒドロエピアンドロステロン硫酸を介して結合したアルカリ性フォスファターゼ標識デヒドロエピアンドロステロン硫酸を、4メチ

50

ルウンベリフェリルりん酸塩を添加し、単位時間当たりの4メチルウンベリフェロンの生成 ( $nM/秒$ ) を蛍光測定した。なお、本生成度はアルカリ性フォスファターゼ量に比例する。

【0019】

デヒドロエピアンドロステロン硫酸測定反応試薬は、以下のようにして調製した。ヤギ抗ウサギ抗体を固定化させた担体にアルカリ性フォスファターゼ標識デヒドロエピアンドロステロン硫酸を含む溶液を添加し凍結させた後に、ウサギ抗デヒドロエピアンドロステロン硫酸抗体を含む溶液を添加し、凍結乾燥してデヒドロエピアンドロステロン硫酸測定試薬 (試薬A) を作製した。また、同一条件で2ヒドロキシ3ナフトエ酸ナトリウムを0.67% (w/v) 添加したデヒドロエピアンドロステロン硫酸測定試薬 (試薬B) を作製した。さらに同様に2アミノナフタレンスルホン酸ナトリウムを2.67% (w/v) 添加したデヒドロエピアンドロステロン硫酸測定試薬 (試薬C) を作製した。

10

【0020】

デヒドロエピアンドロステロン硫酸標準液は、脱ステロイドヒト血清に、市販デヒドロエピアンドロステロン硫酸 (シグマ社製) を0、5、12、60、300、1200  $\mu g/dl$  になるように添加して調製した。

【0021】

次に、上記のようにして調製した試薬A、B、Cを用い、前記自動免疫測定装置で前記のようにして調製した標準液を測定し、アルカリ性フォスファターゼの蛍光基質である4メチルウンベリフェロンの蛍光強度の増加速度をそれぞれ測定した ( $nM/sec$ )。なお、各標準液は3回ずつ測定した。

20

【0022】

各標準液濃度 ( $\mu g/dl$ ) において、標識化デヒドロエピアンドロステロン硫酸の抗体への結合率 ( $B/B_0$ ) を「 $B/B_0 = (各標準液の蛍光増加速度 / 濃度0の標準液の蛍光増加速度) \times 100$ 」により算出した。結果を表1に示す。

【0023】

【表1】

標準液濃度 ( $\mu g/dl$ )	試薬A		試薬B		試薬C	
	$nM/sec$	$B/B_0\%$	$nM/sec$	$B/B_0\%$	$nM/sec$	$B/B_0\%$
0.0	75.3	100	47.4	100	33.5	100
5.0	70.5	93.6	34.6	73.1	26.5	79.3
12.4	63.6	84.4	27.0	56.9	21.6	64.5
59.3	44.6	59.2	12.5	26.3	10.1	30.1
300.9	22.7	30.1	4.4	9.2	3.5	10.4
1281.3	9.3	12.4	1.7	3.5	1.3	3.8

30

40

【0024】

表1から明らかのように、標準液5  $\mu g/dl$  の時に、試薬A、B、Cの結合率  $B/B_0$  を比較すると、2ヒドロキシ3ナフトエ酸ナトリウムや2アミノナフタレンスルホン酸ナトリウムを含有する試薬B、Cの方がはるかに低いことから、同濃度の標準液を加えた場合でも、試薬B、Cの方が遊離のデヒドロエピアンドロステロン硫酸の量が多く、標識化デヒドロエピアンドロステロン硫酸と競合したことが分かる。したがって、2ヒドロキシ3ナフトエ酸ナトリウムや2アミノナフタレンスルホン酸ナトリウムを共存させることにより、デヒドロエピアンドロステロン硫酸を感度よく測定することができる。

【0025】

50

「濃度0の蛍光増加速度 - 2 × 濃度0の蛍光増加速度の標準偏差」を、上記した各標準液の測定結果から作成した検量線を用いて濃度 ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) に換算した値を最小検出限界 (MDC) とした。結果を表2に示す。

【0026】

【表2】

	試薬A	試薬B	試薬C
MDC ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ )	1.33	0.20	0.17

【0027】

MDCは2-ヒドロキシ-3-ナフトエ酸ナトリウムや2-アミノナフタレンスルホン酸ナトリウムを含有する試薬B、Cの方がはるかに低いことが分かる。したがって、2-ヒドロキシ-3-ナフトエ酸ナトリウムや2-アミノナフタレンスルホン酸ナトリウムを共存させることにより、低濃度のデヒドロエピアンドロステロン硫酸を精度よく測定することができる。

【実施例2】

【0028】

免疫測定装置としてAIA-1800自動免疫測定装置(商品名、東ソー(株)製)を用い、1ステップ競合法によりエストラジオールの測定を行った。なお、測定に必要な試薬は後述したようにして調製した。

【0029】

まず、ヤギ抗ウサギ抗体を固定化した担体およびアルカリ性フォスファターゼにて標識されたエストラジオールとウサギ抗エストラジオール抗体を含む反応カップに試験試料(血清)を添加し37℃にて攪拌保温した。なお反応カップは、試験試料添加時に標識エストラジオールと競合して反応するようにするため最初にヤギ抗ウサギ抗体を固定化した担体とアルカリ性フォスファターゼ標識エストラジオール溶液を分注して凍結した後、ウサギ抗エストラジオール抗体溶液を分注して凍結し凍結乾燥したものを作製した。

【0030】

次に、未反応物をB/F分離により除去しエストラジオールを介して結合したアルカリ性フォスファターゼ標識エストラジオールを、4-メチルウンベリフェリルりん酸塩を添加し、単位時間当たりの4-メチルウンベリフェロンの生成( $\text{nM}/\text{秒}$ )を蛍光測定した。なお、本生成度はアルカリ性フォスファターゼ量に比例する。

【0031】

エストラジオール測定反応試薬は、以下のようにして調製した。ヤギ抗ウサギ抗体を固定化させた担体にアルカリ性フォスファターゼ標識エストラジオールを含む溶液を添加し凍結させた後に、ウサギ抗エストラジオール抗体を含む溶液を添加し、凍結乾燥してエストラジオール測定試薬(試薬D)を作製した。また、同一条件でアニリン-2,5-ジスルホン酸1ナトリウムを1.33%(w/v)添加したエストラジオール測定試薬(試薬E)を作製した。さらに同様に3-アミノ-2,7-ナフタレンジスルホン酸1ナトリウムを0.67%(w/v)添加したエストラジオール測定試薬(試薬F)を作製した。

【0032】

エストラジオール標準液は、脱エストラジオールヒト血清に、市販エストラジオール(SIGMA社)を0、42、105、516、1030、3270  $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加して調製した。

【0033】

次に、上記のようにして調製した試薬D、E、Fを用い、前記自動免疫測定装置で前記のようにして調製した標準液を測定し、アルカリ性フォスファターゼの蛍光基質である4-メチルウンベリフェロンの蛍光強度の増加速度をそれぞれ測定した( $\text{nM}/\text{sec}$ )。なお、各標準液は3回ずつ測定した。

【0034】

10

20

30

40

50

各標準液濃度 (  $\text{pg/ml}$  ) において、標識化エストラジオールの抗体への結合率 (  $B/B_0$  ) を前記のようにして算出した。結果を表 3 に示す。

【 0 0 3 5 】

【表 3】

標準液濃度 ( $\text{pg/ml}$ )	試薬D		試薬E		試薬F	
	nM/ sec	B/B <sub>0</sub> %	nM/ sec	B/B <sub>0</sub> %	nM/ sec	B/B <sub>0</sub> %
0	147	100	76	100	139	100
42	142	96.6	73	95.6	132	94.8
105	136	93.0	68	89.8	122	87.4
516	106	72.1	48	63.2	77	55.4
1,030	84	57.3	32	42.5	52	37.3
3,270	41	28.1	14	18.3	20	14.6

10

【 0 0 3 6 】

表 3 から明らかなように、標準液  $42 \text{ pg/ml}$  の時に、試薬 D、E、F の結合率  $B/B_0$  を比較すると、アニリン 2, 5 ジスルホン酸 1 ナトリウムや 3 アミノ 2, 7 ナフタレンジスルホン酸 1 ナトリウムを含有する試薬 E、F の方が低いことから、同濃度の標準液を加えた場合でも、試薬 E、F の方が遊離のエストラジオールの量が多く、標識化エストラジオールと競合したことが分かる。したがって、アニリン 2, 5 ジスルホン酸 1 ナトリウムや 3 アミノ 2, 7 ナフタレンジスルホン酸 1 ナトリウムを共存させることにより、エストラジオールを感度よく測定することができる。

20

【 0 0 3 7 】

次に、前記のようにして最小検出限界 ( MDC ) 算出した。結果を表 4 に示す。

【 0 0 3 8 】

【表 4】

	試薬D	試薬E	試薬F
MDC ( $\text{pg/ml}$ )	21.3	20.8	16.5

30

【 0 0 3 9 】

MDC はアニリン 2, 5 ジスルホン酸 1 ナトリウムや 3 アミノ 2, 7 ナフタレンジスルホン酸 1 ナトリウムを含有する試薬 E、F の方が低い事が分かる。したがって、アニリン 2, 5 ジスルホン酸 1 ナトリウムや 3 アミノ 2, 7 ナフタレンジスルホン酸 1 ナトリウムを共存させることにより、低濃度のエストラジオールを精度よく測定することができる。

40

---

フロントページの続き

(56)参考文献 特開昭53-101521(JP,A)  
特公昭61-012547(JP,B1)  
特許第4130958(JP,B2)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N 33/48-33/98

专利名称(译)	测量血液中类固醇激素或维生素的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP5343825B2</a>	公开(公告)日	2013-11-13
申请号	JP2009273905	申请日	2009-12-01
[标]申请(专利权)人(译)	东曹株式会社		
申请(专利权)人(译)	Tosoh公司		
当前申请(专利权)人(译)	Tosoh公司		
[标]发明人	堀田秀樹 新谷晃司		
发明人	堀田 秀樹 新谷 晃司		
IPC分类号	G01N33/53		
FI分类号	G01N33/53.A G01N33/53.H		
其他公开文献	JP2011117779A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种对待测物体进行免疫测定的方法，该方法需要通过免疫测定类固醇激素或维生素的简单操作在低浓度范围内测量精确度。溶液：该化合物选自2-羟基-3-萘甲酸，2-氨基萘磺酸，苯胺-2,5-二磺酸，3-氨基-2,7-萘二磺酸及其盐。通过一种或多种的共存，可以通过免疫测定准确地测量低浓度的类固醇激素或维生素。【选择图表】无

標準液濃度 ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ )	試薬A		試薬B		試薬C	
	nM/ sec	B/B <sub>0</sub> %	nM/ sec	B/B <sub>0</sub> %	nM/ sec	B/B <sub>0</sub> %
0.0	75.3	100	47.4	100	33.5	100
5.0	70.5	93.6	34.6	73.1	26.5	79.3
12.4	63.6	84.4	27.0	56.9	21.6	64.5
59.3	44.6	59.2	12.5	26.3	10.1	30.1
300.9	22.7	30.1	4.4	9.2	3.5	10.4
1281.3	9.3	12.4	1.7	3.5	1.3	3.8